

JP8122334

Publication Title:

SPECIFIC MEASURING AGENT AND MEASURING METHOD FOR
ENDOTOXIN

Abstract:

Abstract of JP 8122334

(A) Translate this text PURPOSE: To enable the measuring of endotoxin in a specimen handily and specifically by making a polycarbonate derivative or a glycelyl derivative of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan coexist with a horseshoe amebocyte lysate reagent. CONSTITUTION: In the measuring of endotoxin in a specimen using a horseshoe amebocyte lysate (abbreviated as lysate) reagent, sometimes, a correct result can not be obtained because a G factor based reaction proceeds by a β -glucan sensitive factor possibly contained in the specimen. To solve this problem, a polycarbonate derivative or a glycelyl derivative of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan is made to coexist with the lysate to block the G reactor based reaction so strongly by a selection system so that a C factor based reaction by the endotoxin is not inhibited in substance.; Thus, a G factor in the lysate is removed by adsorption thereby enabling the measuring of the endotoxin accurately only under the C factor based reaction.

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-122334

(43)公開日 平成8年(1996)5月17日

(51)Int.Cl.⁸

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 33/579

審査請求 未請求 請求項の数8 F D (全 11 頁)

(21)出願番号 特願平6-283941

(22)出願日 平成6年(1994)10月25日

(71)出願人 000195524

生化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本町2丁目1番5号

(72)発明者 明田川 純

東京都立川市幸町四丁目52番地の1

(72)発明者 田村 弘志

東京都武蔵村山市中藤四丁目6番の13

(72)発明者 田中 重則

東京都小平市小川西町五丁目3番15号

(74)代理人 弁理士 萩野 平 (外3名)

(54)【発明の名称】 エンドトキシンの特異的測定剤および測定方法

(57)【要約】

【目的】カプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬（ライセート試薬）を用いて検体中のE_tを測定するに際し、ライセートに含まれるG因子（ β -グルカン感受性因子）の影響を受けずに、C因子系反応のみを利用して、E_tを簡便かつ特異的に測定すること。

【構成】ライセート試薬に(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体を共存させるエンドトキシン（E_t）の特異的測定剤、ライセート試薬を用いて検体中のエンドトキシンを測定するに際し、の多糖誘導体を共存させるE_tの特異的測定法、の多糖誘導体を不溶性担体に固定化した不溶性固定化物にライセートを接触させることによって得られるE_tの特異的測定剤、検体との特異的測定剤を混合するE_tの特異的測定法、の多糖誘導体を有効成分として含有するG因子活性化阻害剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 カプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬に(1→3)- β -D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体を共存させることを特徴とするエンドトキシンの特異的測定剤。

【請求項2】 カプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬を用いて検体中のエンドトキシンを測定するに際し、カプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬中および/または検体中に(1→3)- β -D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体を共存させ、該試薬中に含まれる成分のエンドトキシんに起因する変化を測定または判定することを特徴とするエンドトキシンの特異的測定法。

【請求項3】 検体とカプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬との混合物中の合成基質水解能を測定する、請求項2のエンドトキシンの特異的測定法。

【請求項4】 検体とカプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬との混合物中のゲル形成能を判定または測定する、請求項2のエンドトキシンの特異的測定法。

【請求項5】 (1→3)- β -D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体を不溶性担体に固定化して得られる不溶性固定化物にカプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬を接触させることによって得られるエンドトキシンの特異的測定剤。

【請求項6】 前記不溶性担体が、セルロース、アガロース、架橋デキストラン、ポリアクリルアミド、多孔質ガラスおよび親水性ポリビニル系合成ポリマーからなる群から選ばれた担体のヒドラジン誘導体またはヒドラジド誘導体であることを特徴とする請求項5記載のエンドトキシンの特異的測定剤。

【請求項7】 検体と請求項5または6に記載の特異的測定剤を混合し、該測定剤中に含まれる成分のエンドトキシんに起因する変化を測定または判定することを特徴とするエンドトキシンの特異的測定法。

【請求項8】 (1→3)- β -D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体を有効成分として含有し、カプトガニ・アメボサイト中のG因子の(1→3)- β -D-グルカンによる活性化を阻害する作用を有することを特徴とするG因子活性化阻害剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、カプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬を用いるエンドトキシンの特異的測定剤、エンドトキシンの測定法およびG因子活性化阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】カプトガニ・アメボサイト・ライセート(以下単にライセートともいう)を使用して、エンドトキシ(以下Eともいう)を測定する一般的に「リムルテスト」と呼ばれる方法が従来から知られており、

検出感度が非常に高いため、医薬品、水などの汚染試験、臨床検査など多方面に汎用されている。なお、この測定に関するライセートの反応は「リムルス反応」と呼ばれている。この方法は、微量のEによりライセートが凝固することに基づいているが、その後の生化学的解明により、該反応はいくつかの凝固因子の段階的活性化より成ることが明らかにされている(J. Protein Chem., 5, 255-268(1986))。

【0003】この反応を、例えば日本産カプトガニ(*Tachyplesus tridentatus*)から得られるライセートにより、図1を用いて説明すると、ライセートにEが加わると、ライセート中に存在するC因子(Eも感受性因子、分子量123,000)が活性化され、生成した活性型C因子がB因子(分子量64,000)の特定箇所を限定水解して活性型B因子を生成し、活性型B因子はプロクロッティングエンザイム(分子量54,000)を活性化してクロッティングエンザイムに変換し、クロッティングエンザイムはコアギュローゲン(凝固タンパク、分子量19,723)のジスルフィド結合で架橋されたループ内の特定箇所、すなわち...Arg¹⁸-Thr¹⁹...の間および...Arg⁴⁶-Gly⁴⁷...の間を限定水解してH-Thr¹⁹...Arg⁴⁶-OHで表されるペプチドC(アミノ酸28残基)を遊離しつつ残余の部分がコアギュリングに変換される、という一連の反応(カスケード反応とも呼ばれる)である。以下Eによる活性化に起因するカスケード反応をC因子系反応という。

【0004】一方、ライセートはEだけでなく(1→3)- β -D-グルカン類(以下 β -グルカンともいう)が加わっても凝固することが明らかになった。すなわち、図1におけるG因子(β -グルカン感受性因子)が活性化され、生成する活性型G因子がプロクロッティングエンザイムをクロッティングエンザイムに活性化し、コアギュリングを生成するというカスケード反応が起こる。以下 β -グルカンによる活性化に起因するカスケード反応をG因子系反応という。

【0005】また、上記の各カスケード反応により生成するクロッティングエンザイムは、反応系に別に添加される合成基質、例えばトキシカルボニルローイシル-グリシル-アルギニン-パラニトロアニリド(Boo-Leu-Gly-Arg-pNA)のアミド結合を水解してパラニトロアニリンを遊離する。したがって、生成した発色物質(パラニトロアニリン)の吸光度を測定することによりEまたは β -グルカンを定量できる。

【0006】このように通常のライセート中にはC因子系反応とG因子系反応の両方の反応に関与する成分が含まれているため、これを用いて検体中のEを測定する際には検体に含まれる可能性のある β -グルカンによってG因子系反応が進行して正しい結果が得られない場合がある。このように、いわゆるリムルテストはEもに

特異的な測定法ではないことが明らかにされ、Eもを特異的に測定する方法が種々検討されている。

【0007】例えば、カードラン、パキマン、スクレロタン、レンチナン、シゾフィラン、コリオラン、ラミナラン、パラミロン、カルボキシメチル化カードランからなる群から選ばれた水溶性多糖をライセートと共存させることによって、C因子系反応に影響を与えることなくG因子の活性化を阻害し、エンドトキシンを特異的に測定できることが知られている(USP 5, 179, 006)。

【0008】しかし、これらの多糖は一般に水に対する溶解度が非常に低いため、大量に用いる必要があり、経済的とはいえない。このような溶解度の低い多糖を用いた場合、最小有効添加量を正確に求めることはできない。また、(1→3)-β-D-グルコシド構造単位を連続して特定個数結合したポリ(1→3)-β-D-グルコシド構造部分を含有するポリグリコシドを有効成分とするG因子活性化阻害剤を利用する方法も報告されている(PCT国際公開WO 90/02951)が、高力価の阻害剤を得るためには、分解、分画等の複雑な工程を経る必要があった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、ライセート試薬を用いて検体中のEもを測定するに際し、ライセートに含まれるG因子(β-グルカン感受性因子)の影響を受けずに、C因子系反応のみを利用して、Eもを簡便かつ特異的に測定することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の目的を達成するために、ライセート中のC因子系反応を阻害せずに、G因子系反応、すなわちβ-グルカンによるG因子の活性化および/または活性型G因子の活性を選択的に阻害し、かつ水に対する溶解度の高い物質について検討した。その結果、ライセートに(1→3)-β-D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体を共存させることによってEもによるC因子系反応が実質的に阻害されず、かつβ-グルカンによるG因子系反応が強く阻害されることを見出した。さらにまた、該物質を不溶性担体に固定化して得られる不溶性固定化物にライセート試薬を接触させることによって、ライセート中のG因子のみを特異的に吸着除去できることを見出した。

【0011】本発明は、以下により構成される。

1) カプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬に(1→3)-β-D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体を共存させることを特徴とするエンドトキシンの特異的測定剤。

2) カプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬を用いて検体中のエンドトキシンを測定するに際し、カプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬中および/または検

体中に(1→3)-β-D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体を共存させ、該試薬中に含まれる成分のエンドトキシンに起因する変化を測定または判定することを特徴とするエンドトキシンの特異的測定法。

3) 検体とカプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬との混合物中の合成基質水解能を測定する、前記2)のエンドトキシンの特異的測定法。

4) 検体とカプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬との混合物中のゲル形成能を判定または測定する、前記2)のエンドトキシンの特異的測定法。

5) (1→3)-β-D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体を不溶性担体に固定化して得られる不溶性固定化物にカプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬を接触させることによって得られるエンドトキシンの特異的測定剤。

6) 前記不溶性担体が、セルロース、アガロース、架橋デキストラン、ポリアクリルアミド、多孔質ガラスおよび親水性ポリビニル系合成ポリマーからなる群から選ばれた担体のヒドラジン誘導体またはヒドラジド誘導体であることを特徴とする前記5)記載のエンドトキシンの特異的測定剤。

7) 検体と前記5)または6)に記載の特異的測定剤を混合し、該測定剤中に含まれる成分のエンドトキシンに起因する変化を測定または判定することを特徴とするエンドトキシンの特異的測定法。

8) (1→3)-β-D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体を有効成分として含有し、カプトガニ・アメボサイト中のG因子の(1→3)-β-D-グルカンによる活性化を阻害する作用を有することを特徴とするG因子活性化阻害剤。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0012】本発明で使用される多糖誘導体は、(1→3)-β-D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体である。(1→3)-β-D-グルカン類とは、(1→3)-β-D-グルコシド結合のみから構成されるポリ(1→3)-β-D-グルコシドの他、このポリ(1→3)-β-D-グルコシドを主鎖とし、この主鎖中あるいは分岐構造中に(1→6)-β-D-グルコシドや(1→4)-β-D-グルコシドなどの構造部分を包含する化合物を意味する。該化合物のグルコース残基の任意の水酸基(-OH)は、-ORとしてして化学修飾されていてもよい。ここで、Rはメチル基、ヒドロキシメチル基、カルボキシメチル基、アセチル基、ヒドロキシエチル基、ヒドロキシプロピル基、スルホプロピル基、硫酸基、リン酸基等もしくはそれらの塩(金属塩、アンモニウム塩及び有機アミン塩等)を表す。本発明に使用されるポリカルボン酸誘導体の製法は、特に制限はないが、(1→3)-β-D-グルカン類の(1→3)-β-D-グルコシド以外のグルコース残基を開裂および酸化することにより、そのグルコース残基1個当たり2個のカル

ボキシシル基を形成する方法が挙げられる。開裂する方法としては、過ヨウ素酸またはその塩を用いる方法が、開裂により生じたジアルデヒドを酸化する方法としては、亜塩素酸またはその塩を用いる方法が例示される。ポリカルボン酸誘導体の製造に用いられる(1→3)-β-D-グルカン類は、上記開裂および酸化によりジカルボン酸を与えるグルコース残基を必要とする。このような(1→3)-β-D-グルカン類としては、(1→6)-(1→3)-β-D-グルカン類および(1→4)-(1→3)-β-D-グルカン類が挙げられる。ここで、(1→6)-(1→3)-β-D-グルカン類は、ポリ(1→3)-β-D-グルコシドからなる主鎖に(1→6)-β-D-グルコシル分岐を有するものであり、その分岐構造は、ポリ(1→3)-β-D-グルコシドのグルコース残基の6位の水酸基と(1→6)-β-結合したグルコース残基を少なくとも1個含む構造である。従って、この分岐構造はポリ(1→6)-β-D-グルコシド構造を含む。また、該ポリ(1→6)-β-D-グルコシド構造に主鎖以外のポリ(1→3)-β-D-グルコシド構造が連結していてもよい。また、(1→4)-(1→3)-β-D-グルカン類はポリ(1→4)-β-D-グルコシド構造とポリ(1→3)-β-D-グルコシド構造が交互に連結して主鎖を成すものである。例えば、(1→6)-β-D-グルコシル分岐(1→3)-β-D-グルカン類〔(1→6)-(1→3)-β-D-グルカン類〕のポリカルボキシ化は基本的にはHofreiterらの方法(J. Am. Chem. Soc., 7, 6457-6460 (1957))により達成される。すなわち、過ヨウ素酸またはその塩(ナトリウム塩、カリウム塩等)により、該(1→6)-β-D-グルコシル分岐(1→3)-β-D-グルカン類の(1→3)-β-D-グルコシドを除く過ヨウ素酸酸化が可能なグルコース残基(即ち、隣接して水酸基がある結合)、例えば、(1→6)-β-D-グルコシドの場合は、2位と3位、3位と4位の各結合を酸化開裂し、蟻酸の生成と共に2, 4-ジアルデヒド体とした後、亜塩素酸塩で更に酸化することにより該グルコース1残基あたり次式(1)で表される

2個のカルボキシ基をもつ基を有したポリカルボン酸誘導体が得られる。

【0013】

【化1】

【0014】本発明に使用されるポリカルボン酸誘導体の原料の(1→3)-β-D-グルカン類は、PCT国際公開W O 9 0 / 0 2 9 5 1 に記載された如く、1分子中に分岐構造あるいは修飾基(式(1)の基を含む)を有さない(1→3)-β-D-グルコシドが、特定個数(2~370個)連結した部分を、少なくとも1ヶ所有したものであれば良い。その分子量には特に制限はないが、通常、400~1,000,000の範囲のものが用いられる。本発明に使用されるポリカルボン酸誘導体の式(1)の基が導入可能なグルコール残基(即ち、隣接して水酸基をもつグルコース残基)当たりの置換度(DS)は通常、0.001~1、好ましくは、0.01~1である。本発明に使用される(1→6)-β-D-グルコシル分岐(1→3)-β-D-グルカン類は、天然にはサルノコシカケ科等に属する担子菌類から得られ、具体例としてはSclerotinia属由来のスクレロタン、Schizophyllum属(スエヒロタケ)由来のシゾフィラン、Sclerotium属、Corticium属、Stromatinia属等に由来するスクレログルカン類、Lentinus属(シイタケ)由来のレンチナン等が挙げられる。例えば、化2に示すシゾフィランおよびそれを過ヨウ素酸酸化を通して得られるシゾフィランのポリカルボン酸誘導体(化3に示す)の構造式は次で示される。

【0015】

【化2】

【0016】

【化3】

【0017】また、(1→4)(1→3)-β-D-グルカン類としては、天然に存在するCetraria属、Usnea属、Evernia属等に由来するリケナンやオオムギ胚乳中に含まれるβ-グルカン等が挙げられる。

【0018】本発明のグリセリル誘導体は、前記(1→3)-β-D-グルカン類のグルコース残基の水酸基がグリセリル化されたものであり、次式(2)で表すことができる。

(D)_pC (2)

(ここで、Dは-O-CH₂-CH(OH)-CH₂-OHを表し、Cは(1→3)-β-D-グルカン類中のグルコース残基であり、該残基中p個の水酸基がDで置換されている。ここで、pは0～3の整数を表わす。)

本発明に使用されるグリセリル誘導体は、PCT国際公開WO90/02951に記載の方法、即ち、G因子活性化物質、G因子、凝固酵素前駆体、及び凝固酵素が水解しうる発色合成基質を含有する反応混液に検体あるいは蒸留水を添加し、一定時間加温した後、遊離する発色物質(パラニトロアニリン等)を比色定量し、比較することにより、検体のG因子活性化阻害能を測定する方法、で定義、測定されるG因子活性化阻害力価が100単位/mg以上になるように置換度を調節して修飾基を導入することにより得られる。この際置換基Dの置換度(DS:(1→3)-β-D-グルコシド1残基当たりのDの数)は通常、0.001～1、好ましくは、0.01～0.9である。本発明のグリセリル誘導体の分子量には、制限はないが、通常400～1,000,000の範囲である。該(1→3)-β-D-グルカン類のグリセリル化は、Kishidaらの方法(Carbohydr. Polym., 17, 89-95 (1992))により達成される。すなわち、該グルカン類を0.4-0.5Nのアルカリ性水溶液に溶解後、エピクロロヒドリンを5%(v/v)程度加えて30～50℃で1～5時間加温してエポキシ化誘導体とした後、蒸留水に対して透析する。得られたエポキシ化誘導体を0.1Nのアルカリ性水溶液に溶かし、55℃で5～7時間攪拌する。室温まで冷却後、蒸留水に対して透析することによりグリセリル誘導体を得られる。以上の反応を式で示すと以下の通りとなる。ただし、C⁶はグルコース残基を示す。

【0019】

【化4】

【0020】式(2)において、Dの置換度は、オキシラン基導入反応のpH、温度、時間および該グルカン類に対するエピクロロヒドリンの使用量を調整することにより可能である。グリセリル化される(1→3)-β-D-グルカン類のうち、天然から得られるものとしては、Alcaligenes属、Rhizobium属等の土壌細菌から細胞外に分泌されるカードランおよび類似グルカン、鞭毛藻(Euglena属)由来のパラミロン、高等植物の繊維組織由来のβ-グルカン、高等植物の篩管から抽出されるカロース、褐藻類由来のラミナラン等が挙げられる。またこれらのグルカン類を酸あるいは酵素分解し、低分子化した後用いてもよい。

【0021】本発明で使用されるカプトガニ・アメボサイト・ライセート試薬(以下、単にライセート試薬ともいう)としては、リムルス・ポリフェムス(Limulus polyphemus)、タキプレウス・トリデンタトゥス(Tachypleus tridentatus)、タキプレウス・ギガス(T. gigas)、カルシノスコルピウス・ロツンディカウダ(Carcinoscopus rotundicauda)等のカプトガニ血リンパ液から、通常の方法(例えば、J. Biochem., 80, 1011-1021(1976)参照)により調製した血球抽出物を挙げる事ができる。また、これらの抽出物にC因子の活性化に有効な二価金属塩〔例えば、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウムなどのアルカリ土類金属のハロゲン化水素酸塩(塩化物など)、硫酸塩等〕、クロッティングエンザイムの基質(例えば、前記のBoc-Leu-Gly-Arg-pNAのような合成基質)、pH調整剤(トリス-塩酸緩衝液などの緩衝剤)を必要に応じて添加したものであってもよい。さらに、ライセート試薬としては、市販のものも使用することができる。なお、このようなライセート試薬は液体、粉末、固形物等のいずれの形態であってもよい。

【0022】本発明の目的を達成するためには、(A)ライセート試薬に該多糖誘導体を共存させ、G因子系反応に関与する成分が不活化されたライセート試薬(以下「多糖誘導体含有ライセート試薬」ということもある)

として測定に供する方法、(B)検体中に該多糖誘導体を添加することによって共存させ、通常のライセート試薬を使用してこの該多糖誘導体添加検体を測定する際にライセート試薬中のG因子系反応に関与する成分の活性化を阻害する方法、(C)(A)および(B)の併用、すなわちライセート試薬と検体双方に該多糖誘導体を共存させる方法、または(D)該多糖誘導体を不溶性担体に固定化して得られる不溶性固定化物にライセート試薬を接触させ、ライセート試薬中のG因子を吸着除去することにより、エンドトキシンに特異的に反応する測定剤であるライセート試薬(以下、「G因子不含ライセート試薬」ということもある)を得、これを測定に供する方法等が採用される。

【0023】ここで、ライセート試薬中のG因子系反応を完全に阻害するのに必要な該多糖誘導体の量は、例えば、次のようにして決定することができる。氷冷下、一定量のライセート試薬に、該多糖誘導体(E_tを含有しないもの)の量を変えて加え、それらに通常の測定条件下においてライセート試薬を十分に活性化する一定量のβ-グルカン(E_tを含有しないもの)を加えて、通常のライセート試薬使用時と同条件で反応させる。この条件下でβ-グルカンによるライセート試薬の活性化を完全に阻害する該多糖誘導体の量を求める。

【0024】E_tを測定する方法において該多糖誘導体をライセート試薬および/または検体中に共存させる方法としては、例えば、下記〜等が挙げられる。

ライセート試薬の抽出調製時に該多糖誘導体を添加して調製した多糖誘導体含有ライセート試薬を使用する方法。

抽出したライセート試薬に該多糖誘導体を添加した多糖誘導体含有ライセート試薬を使用する方法。

ライセート試薬の凍結乾燥品を該多糖誘導体含有溶液中で溶解した多糖誘導体含有ライセート試薬を使用する方法。

ライセート試薬の凍結乾燥品を適当な溶解液で溶解した溶液に該多糖誘導体を添加して調製した多糖誘導体含有ライセート試薬を使用する方法。

該多糖誘導体を添加して抽出調製したライセート試薬またはライセート試薬中に予め必要量の該多糖誘導体を共存させ凍結乾燥して得た試薬を適当な溶解液で溶解した多糖誘導体含有ライセート試薬を使用する方法。

ライセート試薬と合成基質の凍結乾燥品を該多糖誘導体含有溶液中で溶解するかまたは適当な溶液で溶解して調製した溶液に、該多糖誘導体を添加する方法。

ライセート試薬と合成基質の混合液中に予め必要量の該多糖誘導体を共存させ凍結乾燥して得た試薬を適当な溶解液で溶解して用いる方法。

必要量の該多糖誘導体を検体に添加する方法。

【0025】要するに、本発明を使用したE_tの測定法においては、ライセート試薬中のC因子系反応が目的に

合った感度及び測定範囲で機能し、E_tの定量もしくは定性的測定が可能であれば、該多糖誘導体の使用法は任意である。また、該多糖誘導体を固定化するために用いられる不溶性担体としては、水酸基やカルバモイル基などの親水性の基を有する不溶性担体であれば何れも使用可能である。これらの不溶性担体としては、セルロース(例えば、セルロースパウダー(アドバンテック東洋販売)、セルロファイン(生化学工業(株)販売)、アビセル(フナコシ薬品販売)、セレックス(バイオラッド販売)など)、アガロース(例えば、セファロース(ファルマシア販売)、バイオゲルA(バイオラッド販売)、クロマゲルA(同仁化学販売)、サガバック(セラバックラボラトリーズ販売)、ゲラロース(リテックス販売)、P-Lアガロース(P-Lバイオケミカルズ販売)など)、架橋デキストラン(例えば、セファデックスG、セファクリル(ファルマシア販売)、P-Lデックス(P-Lバイオケミカルズ販売)など)、ポリアクリルアミド(例えば、バイオゲルP(バイオラッド販売)、クロマゲルP(同仁化学販売)など)、多孔質ガラス(例えば、バイオグラス(バイオラッド販売)など)、親水性ポリビニル系合成ポリマー(例えば、トヨパール(東ソー販売)など)などが挙げられる。これらの不溶性担体に該多糖誘導体を固定化するためには不溶性担体を活性化する必要がある。この方法としては、種々のものがあり、例えば、水酸基を有する担体に対しては、臭化シアンによる方法(R. Axen, J. Porath, and S. Ernback, Nature, 214, 1302(1967))やオキシラン類による方法(J. Porath and N. Fornstedt, J. Chromatogr., 51, 479(1970)およびL. Sundberg and J. Porath, J. Chromatogr., 90, 87(1974))、又、カルバモイル基を有する担体に対しては、アルキルジアミンを用いてアミノアルキルアミン誘導体とする方法やヒドラジンを用いてヒドラジド誘導体とする方法(共にJ. K. Inman and H. M. Dintzis, Biochemistry, 8, 4074(1969))などが挙げられるが、安定でかつ非特異的吸着の少ない方法としては、エピクロルヒドリンやビスオキシラン類を用いてエポキシ活性化し、得られたエポキシ活性化不溶性担体を更に抱水ヒドラジンあるいはヒドラジド化合物と反応させて得たヒドラジン誘導体またはヒドラジド誘導体を活性化体として用いる方法(松本勲武ら、特公平5-53802)が優れている。本発明の測定剤を用いてE_tを測定するには、図1のカスケード反応によって生成するクロッティングエンザイムの活性を公知の方法で測定すればよい。

【0026】クロッティングエンザイムのアミダーゼ活性の測定には、基質として、例えば前記のp-ニトロアニリンのような発色性残基を有するペプチド合成基質もしくは発色性残基を有するこれと類似の配列のペプチド合成基質、またはこれと同一もしくは類似の配列のペプチドであって、C末端のアミノ酸のカルボキシル基に前

記発色性残基の代わりに公知の発蛍光性残基、発光性残基、アンモニアなどがアミド結合により置換したペプチド合成基質を使用することができる。クロッティングエンザイムがこれらの合成基質に作用して生成する反応生成物を測定することによって、アミダーゼ活性の測定を行うことができる。具体的には、本発明の測定剤とEtを含む反応系に上記ペプチド合成基質を共存させ、反応（カスケード反応および必要に応じて生成物の他色素等への変換反応）によって生成する色素、蛍光物質またはアンモニアをそれぞれ分光光度計、蛍光光度計、化学発光測定装置、アンモニア検出用電極（特開昭62-148860）等によって測定する方法を例示することができる。

【0027】クロッティングエンザイムのプロテアーゼ活性の測定には、本発明の測定剤中に含まれる（もしくは別途添加した）コアギュローゲン（基質）にクロッティングエンザイムが作用してコアギュリングが生成する際のゲル形成反応を、例えば適当な機器（例えば、濁度測定装置、粘度測定装置等）で測定するか、または肉眼で判定する方法を採用することができる。

【0028】本発明を使用する際には、リムルス反応に際し、前記カスケード反応系の活性化に有効な2価金属塩を共存させる必要がある。このような2価金属塩としては、マグネシウム、カルシウム、ストロンチウムなどのアルカリ土類金属のハロゲン化水素酸塩（塩化物等）、硫酸塩等が例示される。また、本発明の測定剤においては、上記金属塩をリムルス反応時に別に添加してもよいが、通常ライセート試薬に上記2価金属塩を共存させた状態で、非加熱条件下での乾燥処理（例えば、凍結乾燥）を行って固体状態にしたものが望ましい。さらに、上記アミダーゼ活性を測定するための測定剤は、2価金属塩のほかに前記ペプチド合成基質を共存させたものであることが好ましく、これを乾燥処理したものであってもよい。

【0029】本発明によりEtが測定される検体としては、基本的には特に制限なく、Et定量の必要があるものあるいはその存否を確認する必要があるものであればよい。例えば、生体試料、医薬品、医療分野で使用する水等を挙げることができる。

【実施例】以下に実施例を挙げ、本発明をさらに具体的に

に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0030】調製例1：グリセリルカードランの調製
グリセリルカードランは、Kishidaらの方法（Carbohydr. Polym., 17, 89-95(1992)）に従い調製した。すなわち、カードラン（和光純薬工業（株）販売）200mgを0.5MNaOH、100mLに溶解し、これにエピクロロヒドリン4.2mLを加え、攪拌しながら40℃で2時間加熱した後、Etおよびβ-グルカンを含まない蒸留水（以下DWともいう）に対して透析した。透析内液を凍結乾燥し、エポキシ化カードラン（カードランエポキシド）を得た（185mg）。カードランエポキシドの150mgを0.1MNaOH、40mLに溶かし、55℃で6時間攪拌した。室温まで冷却後、反応混液をDWに対して透析し、透析内液を凍結乾燥して、グリセリルカードラン138mgを得た。得られたグリセリルカードランの置換度（DS）は、SundbergとPorathの方法（J. Chromatogr., 90, 87-98（1974））から0.14と推定された。

【0031】調製例2：ポリカルボキシル化シゾフィランの調製
ポリカルボキシル化シゾフィランは、Hofreiterらの方法に従い調製した。すなわち、スエヒロタケ由来のシゾフィラン（科研製薬販売、商品名ソニフィランをDWに対して透析後、凍結乾燥したもの）100mgを90mLのDWに溶かし、0.1M過ヨウ素酸ナトリウム10mLを加えて、遮光下4℃で170時間反応させ、酸化した。過ヨウ素酸塩の消費はAvigadの方法（Carbohydr. Res., 11, 119（1969））で追跡した。過剰のエチレングリコールを加えて反応停止した後、DWに対して透析し、その透析内液に亜塩素酸ナトリウム（酢酸により、pH4.0に調整したもの、終濃度40mM）を加え、25℃で12時間反応させ酸化し、DWに対して透析した後、透析内液を凍結乾燥し、DS0.83のポリカルボキシル化シゾフィラン（Na塩）を得た（収率93.3%）。

【0032】上記の各試料のG因子活性化阻害力価を出発原料であるカードランおよびソニフィランと比較した結果を表1に示す。なお、G因子活性化阻害力価はPCT国際公開WO 90/029511に記載の方法により測定した。

【0033】

【表1】

試料番号	物質名	G因子活性化阻害力価 (単位/mg)
1	カードラン	10
2	グリセリルカードラン	1,150
3	シゾフィラン（商品名：ソニフィラン）	10
4	ポリカルボキシル化シゾフィラン	468,000

【0034】上記表1から、両誘導体はそれぞれ出発原

料に比べ著しく高い（ $10^2 \sim 10^5$ 倍）G因子活性化阻害力

価を有するようになったことがわかる。

【0035】調製例3：ポリカルボキシル化シゾフィラン固定化セルロースの調製

セルロース（セルロファイン、GC-700-m、生化学工業（株）販売）20g（湿重量）をグラスフィルター上でDWでよく洗浄後、吸引濾過した後、フラスコに入れ、DW300mL、2M NaOH水溶液130mLおよびエピクロロヒドリン30mLを順次加えて得られる懸濁液を40℃で2時間振盪した後、グラスフィルター上で充分洗浄してエポキシ活性化セルロファインを得た。得られたエポキシ活性化セルロファイン1容（40mL）に80%ヒドラジン水化物水溶液1.5容（60mL）を加え、40℃で1.5時間振盪した。反応後、グラスフィルター上でDWで充分に洗浄してヒドラジノセルロファインを得た。得られたヒドラジノセルロファインのうち2g（湿重量）に調製例2で得たポリカルボキシル化シゾフィラン50mgと水素化シアノホウ素ナトリウム26mgとを0.2M K_2HPO_4 水溶液1.5mLに溶解したものを加え、室温で3日間振盪した。反応後、グラスフィルター上でDW10mLおよび0.2M酢酸ナトリウム水溶液10mLで順次洗浄した。このものに無水酢酸5mLを加え、0℃で30分間反応させた後、更に無水酢酸5mLを加え、室温で30分間処理して未反応のヒドラジン残基をアセチル化した。反応後、DW、0.1M NaOH水溶液、DW、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で順次洗浄して、ポリカルボキシル化シゾフィラン固定化セルロファインを得た。

【0036】実施例1：ポリカルボキシル化シゾフィランをライセート試薬の抽出調製時に添加する例

日本産カブトガニ（*T. tridentatus*）血リンパ液1.0Lを4℃、1,500rpmで10分間遠心し、その沈殿部分（アメボサイト）約21gにポリカルボキシル化シゾ

フィランを5.25mg含有する0.02Mトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）210mLを加え、ポリトロンR PT10にて均一に破碎および抽出し、10,000×Gで30分間冷却遠心し、上澄液（ポリカルボキシル化シゾフィラン含有ライセート試薬）190mLを得た。

【0037】このポリカルボキシル化シゾフィラン含有ライセート試薬（本発明例）と上記においてポリカルボキシル化シゾフィランを添加しないで調製したライセート試薬（比較例）各々0.04mLに2Mトリス-塩酸緩衝液（pH8.0）0.01mL、0.4M塩化マグネシウム（ $MgCl_2$ ）0.03mL、3.0mM合成基質（Boc-Leu-Gly-Arg-pNA）0.02mLを加え、さらに検体としてDW（ブランク）、Et（大腸菌0111:B4株由来、シグマ社販売のWestphal type）またはβ-グルカン（後述により調製）を別々に0.1mL加えた。また、それぞれ2倍濃度のEtとβ-グルカンを0.05mLずつ同時に添加した。それらを37℃、30分間加温して反応させ、0.6M酢酸0.4mLを加えて反応を停止させ、405nmの吸光度を測定して、生じたパラニトロアニリンを定量し、反応性を比較検討した。ブランクとの差（Δ値）を反応性として、その結果を表2に示した。この結果から、カブトガニ血リンパ液からライセート試薬を抽出する際にポリカルボキシル化シゾフィランを添加して調製したポリカルボキシル化シゾフィラン含有ライセート試薬を用いれば、β-グルカンの影響を受けずに、Etを特異的に測定できることがわかる。言い換えれば、本発明による測定においては、C因子系反応は影響されることなくG因子系反応が実質的に阻害されていることが証明された。

【0038】

【表2】

検体	反応性（ΔA405nm）	
	本発明例	比較例
Et*	0.321	0.353
β-グルカン**	0.000	0.194
Et+β-グルカン	0.321	0.545

* Et濃度：3.0pg/0.1mL検体

** β-グルカン濃度：5.0pg/0.1mL検体

【0039】（β-グルカンの調製法）PCT国際公開W090/02951に記載の方法に準じ、カードラン（和光純薬工業（株）販売）の1gを約100mLの5mM NaOH水溶液に懸濁し、氷冷下で音波発生機、ソニケーター™（大岳製作所、形式5202PZT、東京）により20kHz、80Wで12分間音波処理による低分子化を行った。処理液を5M NaOH水溶液を用い、最終0.3M水溶液とし、ゲルパーミエーション

クロマトグラフィー（GPCカラム：TSK gel G3000PW_{XL} 2本、G2500PW_{XL} 1本、移動相：0.3M NaOH水溶液、流速0.5mL/min）により分画採取し、再クロマトグラフィーにより分子量216,000画分を分画採取し、GPC分画精製標品（β-グルカン標品）を得た。

【0040】実施例2：グリセリルカードランをライセート試薬に添加する例

日本産カブトガニ(*T. tridentatus*) 血リンパ液1.0 Lを4℃、1,500rpmで10分間遠心し、その沈殿部分(アメボサイト)約21gに0.02Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)210mLを加え、ホモゲナイザー(ポリトロンR PT10(商品名)、Kinematica社製造)にて均一に破碎および抽出し、10,000×gで30分間冷却遠心し、上澄液(ライセート試薬)190mLを得た。

【0041】このライセート試薬2.0mLにグリセリルカードラン1mgを添加した後、更に0.4M塩化マグネシウム0.4mLを添加混和した後、凍結乾燥して本発明のEも特異的測定剤を得た。また、ライセート試

薬2.0mLと0.4M $MgCl_2$ 0.4mLとを混和後、凍結乾燥してグリセリルカードランを含まない比較用の測定剤を得た。両凍結乾燥品をそれぞれDW2.0mLに溶解し、その0.1mLに検体として、DW(ブランク)、Eもまたは β -グルカンを別々に0.1mL加え、静かに混和後、37℃、60分間静置加温し、180°転倒してゲル形成の有無を肉眼で判定し、本発明の測定剤の反応性を比較検討した。その結果を表3に示した。表中+はゲル化したことを、-はゲル化しなかったことを表す。

【0042】

【表3】

検体	反応性	
	本発明例	比較例
DW(ブランク)	-	-
Eも*	+	+
β -グルカン**	-	+

* Eも濃度: 4.0pg/0.1mL検体

** β -グルカン濃度: 40.0ng/0.1mL検体

【0043】この結果から、通常の方法で調製したライセート試薬にグリセリルカードランを添加して凍結乾燥することによって、 β -グルカンの影響を受けずに、Eもを特異的に測定できることがわかる。

【0044】実施例3: ポリカルボキシル化シゾフィラン固定化セルロース(セルロファイン)を用いたライセート試薬の調製

調製例3で得たポリカルボキシル化シゾフィラン固定化セルロファイン湿体積0.4mLをガラスフィルター上で、0.1M NaOH1LおよびDW1Lで順次洗浄後、DWを加えて4mLとし、このうち0.2mLにDW1.8mLを加えた懸濁液をポリビニリデンフロライド膜(0.22 μ m、マイレクスGVフィルターユニット、日本ミリポア工業販売、Lot CE11)で濾過し、ポリカルボキシル化シゾフィラン固定化セルロファインが付着したフィルターを得た。実施例2で得たライセート試薬(グリセリルカードラン無添加)1mLを上記のポリカルボキシル化シゾフィラン固定化セルロファイン付着フィルターで濾過し、濾液を得、このうち0.04mLに $MgCl_2$ 1.5 μ gおよび合成基質(Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) 4.0 μ gを加えて凍結乾燥した。この凍結乾燥品に0.02Mトリス-塩酸緩衝液(pH8.0)0.1mLおよび検体(Eもまたは β -グルカンの種々濃度の水溶液)0.1mLを加えて37℃で30分間加温した後、0.6M酢酸0.4mLを加えて反応停止し、405nmにおける吸光度を測定した結果、および未処理ライセート試薬を用いて同様に測定した結果を図2および図3に示す。図中○印は未処理ライセート試薬

を使用した場合の吸光度を、△印はポリカルボキシル化シゾフィラン固定化セルロファインで処理したライセート試薬を使用した場合の吸光度を示す。図から明らかなように、ポリカルボキシル化シゾフィラン固定化セルロファインで処理したライセート試薬は、 β -グルカンとは反応せず、Eもとのみ反応し、これを使用することによってEもの特異的測定が可能である。

【0045】

【発明の効果】本発明は、Eも特異的測定剤をライセート試薬と(1 \rightarrow 3)- β -D-グルカン類のポリカルボン酸誘導体またはグリセリル誘導体とを組み合わせるかあるいは、これらの誘導体を不溶性担体に固定化した不溶性固定化物にライセート試薬を接触させるのみで容易に製造ができるので操作性および経済性において優れている。このようなEも特異的測定剤はEも存在の有無が明確でない感染症、敗血症を疑われている臨床検体を測定する時に特に有用であり、本発明は真のグラム陰性菌感染症(エンドトキセミア)を的確に判別できる利点がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】リムルス反応の機構を説明する図。

【図2】未処理のライセート試薬および本発明により処理したライセート試薬と種々濃度の β -グルカンとを反応させたときの吸光度を示す図。

【図3】未処理のライセート試薬および本発明により処理したライセート試薬と種々濃度のエンドトキシンとを反応させたときの吸光度を示す図。

(10)

特開平8-122334

【図1】

(1 1)

特開平8-1 2 2 3 3 4

【図2】

【図3】